

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE MnO_2 MODIFICIRANE
ELEKTRODE OD UGLJIKOVE PASTE U SVRHU ODREĐIVANJA
VODIKOVOG PEROKSIDA

ZAVRŠNI RAD

IVANA GABELA

Matični broj: 313

Split, rujan 2018

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

**ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE MnO_2 MODIFICIRANE
ELEKTRODE OD UGLJIKOVE PASTE U SVRHU ODREĐIVANJA
VODIKOVOG PEROKSIDA**
ZAVRŠNI RAD

IVANA GABELA

Matični broj: 313

Split, rujan 2018

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY IN CHEMISTRY

**ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF MnO_2 MODIFIED
CARBON PASTE ELECTRODE FOR DETERMINATION OF
HYDROGEN PEROXIDE**

BACHELOR THESIS

IVANA GABELA

Parent number: 313

Split, September 2018

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet

Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na III. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Marijo Buzuk

Pomoć pri izradi: /

ELEKTROKEMIJSKO PONAŠANJE MnO_2 MODIFICIRANE ELEKTRODE OD UGLJIKOVE PASTE U SVRHU ODREĐIVANJA VODIKOVOG PEROKSIDA

Ivana Gabela, 313

Sažetak:

U ovom završnom radu ispitivana je uporaba MnO_2 kao modifikatora za biosenzorsko određivanje glukoze s elektrodama od ugljikove paste. S obzirom na mogućnost redukcije MnO_2 s H_2O_2 (kao produktom enzimske reakcije oksidacije glukoze s glukozom oksidazom) ovaj vid modifikacije ima potencijal za određivanje onih bioloških vrsta, koji u svom enzimskom ciklusu kao produkt reakcije imaju vodikov peroksid. Elektroda pripravljena od ugljikove paste s 5% modifikatora je testirana na tri pH vrijednosti (4, 7, 9) na redoks reakcije H_2O_2 . Kao optimalna pH vrijednost pokazala se pH 9 u boratnom puferu, gdje se indirektno uočila oksidacija vodikovog peroksida. Ova reakcija može se iskoristiti u analitičkom određivanju vrsta koje u svojoj enzimskoj reakciji imaju kao produkt vodikov peroksid.

Ključne riječi: elektrode od ugljikove paste, modifikatori, biosenzori, glukoza

Rad sadrži: 36 stranica, 24 slike, 2 tablice, 30 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivana Škugor Rončević – predsjednik
2. Doc. dr. sc. Maša Buljac – član
3. Doc. dr. sc. Marijo Buzuk – član-mentor

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of chemistry and technology

Undergraduate Study in Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.3

Mentor: Marijo Buzuk – PhD, assistant prof.

Technical assistance: /

ELECTROCHEMICAL BEHAVIOUR OF MnO_2 MODIFIED CARBON PASTE ELECTRODE FOR DETERMINATION OF HYDROGEN PEROXIDE

Ivana Gabela, 313

Abstract:

This final work present using of MnO_2 as a modifier for biosensor glucose determination in carbon paste electrodes. Possibility of reducing MnO_2 with H_2O_2 (as a product of the enzymatic reaction of glucose with glucose oxidase) offer possibility of using this kind of biological species which in their enzymatic cycle have a hydrogen peroxide as reaction product. Electrodes made of carbon paste with 5% modifier were tested at three pH values (4, 7, 9) on redox of H_2O_2 reaction. As an optimal pH value, pH 9 was found in borate buffer, where oxidation of hydrogen peroxide was observed. This reaction can be utilized in analytical determination of species that in its enzyme reaction have the product as hydrogen peroxide.

Keywords: carbon paste electrode, modifiers, biosensors, glucose

Thesis contains: 36 pages, 24 figures, 2 tables, 300 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Ivana Škugor Rončević – PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Maša Buljac – PhD, assistant prof. | member |
| 3. Marijo Buzuk – PhD, assistant prof. | supervisor |

Defence date:

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Marija Buzuka, u razdoblju od travnja do rujna 2018. godine.

Prije svega zahvaljujem svojim roditeljima koji su uvijek bili tu uz mene i gurali me prema naprijed, nedavši mi odustati. Njihova potpora bila mi je vjetar u leđa te zbog njih sam tu gdje jesam.

Zahvaljujem se svim svojim profesorima i kolegama koji su me pratili u ove tri godine školovanja i koji su sa mnom dijelili mnoge trenutke kako dobre, tako i loše.

I posljednjem, ali ne i manje važnom, zahvaljujem se svom mentoru, doc.dr.sc. Mariju Buzuku, koji je uvijek imao strpljenja i volje za mene. Uvijek je bio spreman priskočiti mi u pomoć. Zahvaljujem mu se na prenesenom znanju i na trudu kojeg je uložio da me nauči način na koji treba razmišljati i pristupati problemu. Hvala za sve!

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Ispitati elektrokemijsko ponašanje elektrode od ugljikove paste pri različitim pH vrijednostima.
2. Ispitati utjecaj MnO_2 modifikatora na elektrokemijski odziv prema vodikovom peroksidu pri različitim pH vrijednostima.
3. Objašnjenje pojava koje se mogu uočiti cikličkom voltametrijom.
4. Potvrda uporabe MnO_2 kao modifikatora u izradi biosenzora.

SAŽETAK

U ovom završnom radu ispitivana je uporaba MnO_2 kao modifikatora za biosenzorsko određivanje glukoze s elektrodama od ugljikove paste. S obzirom na mogućnost redukcije MnO_2 s H_2O_2 (kao produktom enzimske reakcije oksidacije glukoze s glukoza oksidazom) ovaj vid modifikacije ima potencijal za određivanje onih bioloških vrsta, koji u svom enzimskom ciklusu kao produkt reakcije imaju vodikov peroksid. Elektroda pripravljena od ugljikove paste s 5% modifikatora je testirana na tri pH vrijednosti (4, 7, 9) na redoks reakcije H_2O_2 . Kao optimalna pH vrijednost pokazala se pH 9 u boratnom puferu, gdje se indirektno uočila oksidacija vodikovog peroksida. Ova reakcija može se iskoristiti u analitičkom određivanju vrsta koje u svojoj enzimskoj reakciji imaju kao produkt vodikov peroksid.

Ključne riječi: elektrode od ugljikove paste, modifikatori, biosenzori, glukoza

SUMMARY

This final work present using of MnO_2 as a modifier for biosensor glucose determination in carbon paste electrodes. Possibility of reducing MnO_2 with H_2O_2 (as a product of the enzymatic reaction of glucose with glucose oxidase) offer possibility of using this kind of biological species which in their enzymatic cycle have a hydrogen peroxide as reaction product. Electrodes made of carbon paste with 5% modifier were tested at three pH values (4, 7, 9) on redox of H_2O_2 reaction. As an optimal pH value, pH 9 was found in borate buffer, where oxidation of hydrogen peroxide was observed. This reaction can be utilized in analytical determination of species that in its enzyme reaction have the product as hydrogen peroxide.

Keywords: carbon paste electrode, modifiers, biosensor, glucose

SADRŽAJ

UVOD	3
1. OPĆI DIO	4
1.1. U središtu radnje – Vodikov peroksid.....	4
1.2. Biosenzori	5
1.2.1. Generacije biosenzora	9
1.2.2. Amperometrijski biosenzori.....	11
1.3. Određivanje peroksida elektrokemijskim biosenzorima	13
1.3.1. Potenciometrijski H_2O_2 biosenzori	13
1.3.2. Amperometrijski H_2O_2 biosenzori	13
2. EKSPERIMENTALNI DIO	17
2.1. Priprava elektrodnog materijala	17
2.2. Priprava otopina	17
2.2.1. Priprava otopine vodikovog peroksida različitih koncentracija.....	17
2.2.2. Priprava otopine kalijevog nitrata - KNO_3	18
2.2.3. Priprava otopine natrijevog acetata - CH_3COONa	19
2.2.4. Priprava otopine acetatnog pufera; pH 4	19
2.2.5. Priprava otopine natrijevog hidrogenfosfata - Na_2HPO_4	19
2.2.6. Priprava otopine fosfatnog pufera; pH 7.....	19
2.2.7. Priprava otopine amonijevog klorida - NH_4Cl	19
2.2.8. Priprava otopine amonijačnog pufera; pH 9	20
2.2.9. Priprava otopine boratnog pufera; pH 9.....	20
2.2.10. Priprava elektrolitne otopine.....	20
2.3. Aparatura.....	20
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
3.1. Elektrokemijsko ponašanje nCPE	21
3.2. Elektrokemijsko ponašanje mCPE.....	27

4. ZAKLJUČAK.....	33
5. LITERATURA	34

UVOD

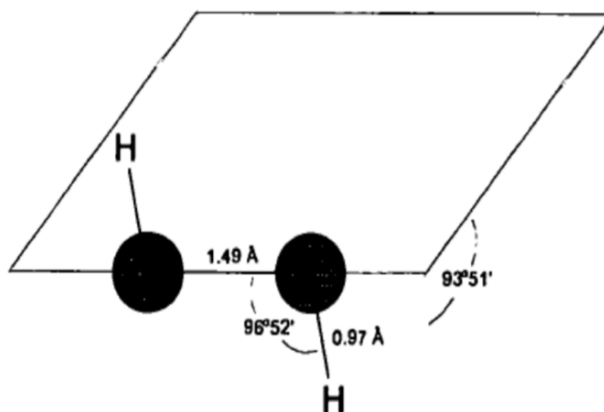
Vodikov peroksid (H_2O_2) jedan je od najvažnijih regulatora u biološkim reakcijama koje su katalizirane oksidazama. Određivanje vodikovog peroksida postavlja temelje mnogim analitičkim tehnikama i komercijalnim testovima poput kalorimetrije, fluorometrije, spektrofotometrije, kemiluminescencije i elektrokemijske metode. Među tim tehnikama, elektrokemijske metode analize pružaju prikladan način određivanja H_2O_2 zbog svoje jednostavnosti, jeftinije instrumentacije, visoke selektivnosti i prikladnosti za otkrivanje i kvantificiranje analita u realnom vremenu. U elektrokemiji, vodikov peroksid može biti izravno reduciran/oksidiran na površini čvrstih elektroda. Određivanje H_2O_2 na konvencionalnim, plemenitim, metalnim elektrodama je ograničeno visokim prenaponom koji usporava kinetiku reakcije. U istraživanjima prethodno navedenih tehnika, otkriveno je kako je određivanje H_2O_2 uglavnom usmjereno prema modificiranim elektrodama kako zbog rješavanja problema niske osjetljivosti tako i zbog visokog radnog potencijala. Elektrokemijski procesi vodikovog peroksida na površinama elektroda mogu se pratiti cikličkom voltametrijom. U ovom radu predstavljen je potencijal elektrode od ugljikove paste modificirane s 5% manganovog (IV) oksida, kao materijala za razvoj senzora osjetljivog na peroksid, kao i primjer elektrokatalitičkog određivanja vodikovog peroksida.

1. OPĆI DIO

1.1. U središtu radnje – Vodikov peroksid

Vodikov peroksid (H_2O_2) jedan je od najvažnijih regulatora u biološkim reakcijama koje su katalizirane oksidazama [1]. H_2O_2 ($M_r = 34,014 \text{ g mol}^{-1}$) je molekula s lančanom, neplanarnom strukturom (Slika 1). Ovisno o koncentraciji ($> 10\%$), djeluje iritirajuće na kožu, oči, gastrointestinalni trakt i sluznicu. H_2O_2 vrlo je važan u biološkim, farmakološkim, medicinskim i ekološkim znanostima, proizvodnji hrane i tekstila [2]. U industrijskim i medicinskim područjima, koristi se za pročišćavanje otpadnih voda, kao sredstvo za izbjeljivanje i za sterilizaciju. H_2O_2 igra ključnu ulogu u reguliranju vitalnih i složenih bioloških puteva, pri rastu i diferencijaciji stanica, apoptozi i imunološkoj aktivaciji [3]. Povišena koncentracija H_2O_2 , uz ostale uzročnike, izaziva pojavu bolesti poput: raka, artritisa, dijabetesa, neurodegenerativnih poremećaja, kardiovaskularnih bolesti, astme i oksidativnog stresa [4,5]. Određivanje vodikovog peroksida postavlja temelje mnogim analitičkim tehnikama i komercijalnim testovima poput kalorimetrije, fluorometrije, spektrofotometrije, kemiluminescencije i elektrokemijske metode [6]. Prve četiri tehnike imaju nedostatke, dugotrajnije su i skupe, zahtijevaju dugotrajne pripreme uzorka, korištenje skupih reagensa i pate od interferencija [7]. Među tim tehnikama, elektrokemijske metode analize pružaju prikladan način određivanja H_2O_2 zbog svoje jednostavnosti, jeftinije instrumentacije, visoke selektivnosti i prikladnosti za otkrivanje i kvantificiranje analita u realnom vremenu [8]. Voltometrija je skup elektroanalitičkih tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzorka kod kojih je signal pobude električni napon, a signal odziva električna struja. Voltometrijska mjerenja provode se u elektrokemijskoj ćeliji, u kojoj se signal pobude nameće između referentne i radne elektrode, a mjeri se struja koja teče između radne elektrode i protuelektrode. Struja, kao signal pobude je funkcija vremena i narinutog napona. Osjetljivost voltometrije omogućuje mjerenje koncentracija od 10^{-9} do $10^{-12} \text{ mol dm}^{-3}$. U elektrokemiji, vodikov peroksid može biti izravno reduciran/oksidiran na površini čvrstih elektroda. Određivanje H_2O_2 na konvencionalnim, plemenitim, metalnim elektrodama je ograničeno visokim prenapom koji usporava kinetiku reakcije. Nadalje, ovaj prenapon kao posljedicu ima pojavu interferencija u uzorku od strane elektroaktivnih vrsta [9]. U istraživanjima prethodno navedenih tehnika, otkriveno je kako je određivanje H_2O_2 uglavnom usmjereno prema modificiranim elektrodama kako zbog rješavanja problema niske osjetljivosti tako i zbog visokog radnog potencijala. U izradi selektivnog H_2O_2 biosenzora

kao modifikatori korištene su nanočestice platine, redoks polimeri, metalni oksidi, nanovlakna, veliki broj naprednih nanomaterijala (grafitne kapsule, tetraetil ortosilikati) [10]. Ove tehnike, u odnosu na konvekcionalne analitičke metode za određivanje H_2O_2 , pokazale su se kao mnogo naprednije i učinkovitije [11].



Slika 1 – Struktura vodikovog peroksida

1.2. Biosenzori

Biosenzori su specijalna vrsta senzora koji sadrže biološki prepoznavajući element (biokemijski receptor). Npr. biosenzor za glukozu je “*bio*” ukoliko sadrži neki od enzima koji kontroliraju specifičnu reakciju glukoze. C-vitamin, poput glukoze, može se određivati sa odgovarajućim biosenzorom. Kako bi se razjasnila razlika između biosenzora i senzora, poslužiti će primjer mokraćne kiseline. Dakle, ukoliko mokraćnu kiselinu određujemo amperometrijski s elektrodom modificiranom s MnO_2 , onda imamo senzor. S druge strane, ako mokraćnu kiselinu određujemo elektrodom koja sadrži komponentu (urat oksidazu) tada imamo biosenzor.

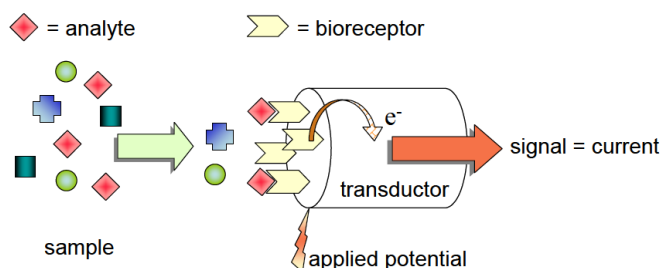
Prema IUPAC-u biosenzori su:

“Uređaji koji koriste specifične biokemijske reakcije djelovanjem izoliranih enzima, imuno sustava, tkiva, organela ili cijelih stanica za detekciju kemijskih spojeva putem električnih, toplinskih i optičkih signala” [12].

Thevenoat [13] predložio je jednu od mnogih definicija biosenzora:

„Biosenzori su samostalni integrirani uređaji koji su sposobni dati određene kvantitativne ili semi-kvantitativne informacije na bazi biološkog prepoznavajućeg elementa (biokemijskog receptora), u direktnom kontaktu sa pretvaračem (transduktor)“.

Za razliku od uobičajenih analitičkih metoda koje koriste glomazne uređaje, mjerenja biosenzorima provode se na netretiranim uzorcima na jednostavan i jeftin način. Neiscrpan model za razvoj biosenzora je priroda sa selektivnim molekulama koje se mogu upotrijebiti za dizajniranje senzora kao tehničkog mjernog uređaja. Kombiniranje prirodnih molekula s metodama koje pruža mikroelektronika, rezultira vrlo često masovnom proizvodnjom biosenzora u obliku čipova. Za sada je neupitno da je postignuta visoka osjetljivost i selektivnost određivanja na kontaktu analit-senzor koja nerijetko višestruko premašuje klasične sofisticirane analitičke tehnike. Slične sustave lako prepoznajemo u prirodi. Svi biološki sustavi po svojoj prirodi su termodinamički neuravnoteženi i kao takvi trebaju različite osjetljive komponente za održavanje kontrole stabilnosti životnih funkcija u interakciji s okolinom. Ovo je ujedno i model razvoja biosenzora za industrijsku primjenu, posebice u području biotehnologije. Jedna od najzastupljenijih vrsta biosenzora su elektrokemijski biosenzori. Elektrokemijski biosenzori se razlikuju od ostalih bioanalitičkih sustava koji zahtijevaju dodatnu pripremu analita, kao što je dodavanje reagensa. Biosenzori se sastoje od dviju glavnih komponenti tj. elementa za biološko prepoznavanje, koji reagiraju s ciljanim analitom, i (pretvarača) transduktora koji transformira interakciju u električni signal [14].



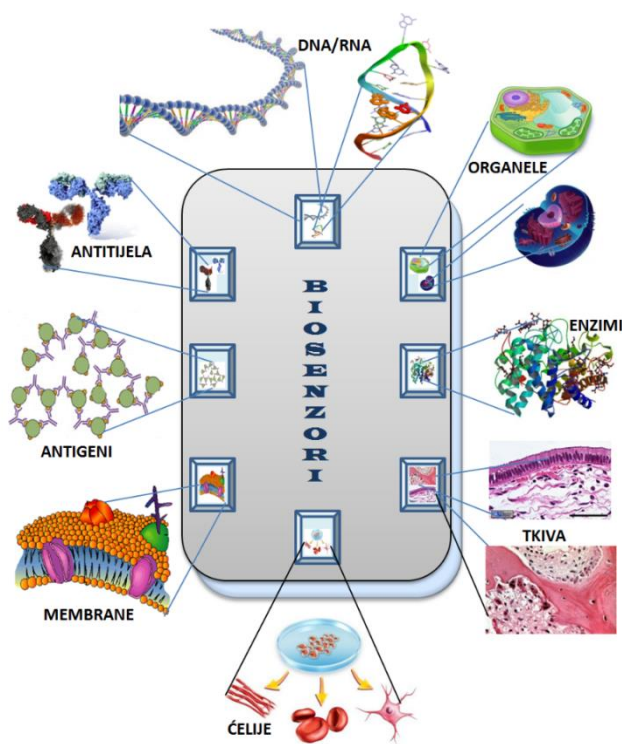
Slika 2 - Princip funkcioniranja amperometrijskog biosenzora.

Jedna od elektrokemijskih tehnika koja se upotrebljava pri izradi biosenzora je kromamperometrija. Tom tehnikom se mjeri struja u funkciji vremena pri čemu se elektroda drži na odgovarajućem konstantnom potencijalu. Signal ovih biosenzora generira se izmjenom elektrona između biološkog sustava (bioreceptora senzora) i elektrode. Za ovu izmjenu bitan faktor je medijator. Kod amperometrijskih biosenzora (Slika 2), analit se

podvrgava redoks reakciji koja se prati mjerenjem struje u elektrokemijskoj ćeliji. Analit na taj način mijenja svoje oksidacijsko stanje na elektrodi i mjeri se struja koja je proporcionalna količini analita koji je reagirao na elektrodi.

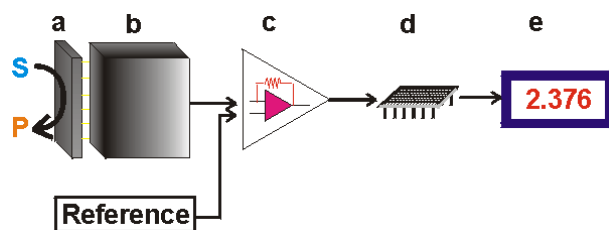
Teoretski, biosenzori se mogu klasificirati prema vrsti elementa za biološko prepoznavanje. Oni mogu biti enzimi, antitijela, DNK, žive ćelije i drugi biološki receptori. Neki od njih mogu se upotrijebiti za određivanje dioksina i polikloriranih bifenila (PCB), poliaromatskih ugljikovodika [PAHs] [15].

Na Slici 3 prikazani su bioreceptori koji se koriste za modifikaciju elektroda u svrhu dizajniranja odgovarajućih biosenzora. Ovako pripremljen bioreceptorski sloj odgovoran je za selektivnost odnosno specifičnost biosenzora prema određenom analitu. Mogu se koristiti brojni biološki ili biološki izvedeni sastojci kao modifikatori elektrode. Ovim se postiže osnovno svojstvo biosenzora, funkcioniranje bez prethodnog tretmana uzorka. Prvi korak u dizajniranju biosenzora je izbor odgovarajućeg bioreceptora tako da prepoznavajuća strana elektrode specifično reagira s ciljanim analitom. Izbor je određen svojstvima analita i njegovom strukturom te prisutnim interferirajućim tvarima u uzorku. U kliničkoj analizi radi se sa biološkim uzorcima s kompleksnom matricom koji sadrže interferencirajuće vrste.



Slika 3 - Bioreceptori za modifikaciju elektrode u izradi biosenzora.

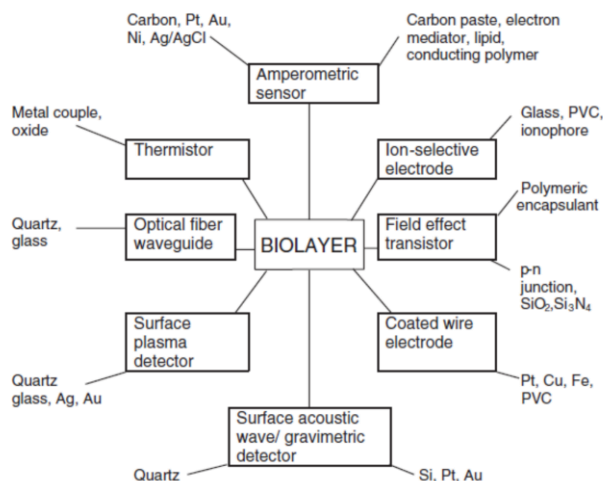
Važno je da se pri dizajniranju biosenzora na bazi enzima omogući vraćanje u početno oksidacijsko stanje redoks aktivnog centra enzima kako bi on zadržao svoju aktivnost za ponovnu reakciju sa analitom.



Slika 4 - Shema glavnih komponenti biosenzora. Biokatalizator (a) konvertira supstrat u produkt. Ova reakcija se prati putem transduktora/pretvornika (b) koji stvara električni signal. Električni signal se pojačava (c), obrađuje i transformira iz analognog u digitalni oblik (d) i prikazuje na računalu.

Ključni dio biosenzora je transduktor-pretvornik, označen na slici 4 sa (b), koji omogućava praćenje promjena fizikalnih veličina tijekom reakcije. To su najčešće:

1. Oslobađanje ili absorpcija topline reakcije kod kalorimetrijskih biosenzora,
2. Promjene u raspodjeli naboja koje uzrokuju električni potencijal (potenciometrijski biosenzori),
3. Tok elektrona (el. struja) nastao kao rezultat redoks reakcije (amperometrijski biosenzori),
4. Svjetlosni tok (elektromagnetno zračenje) ili absorpcija svjetlosti pri reakciji (optički biosenzori),
5. Efekti promjene mase reaktanata ili produkata (piezo-električni biosenzori).



Slika 5 - Različite konfiguracije biosenzora

Najpoznatiji biosenzor za glukozu je razvijen na enzimu glukoza oksidazi (*GOx*), a koji katalizira oksidaciju glukoze sa kisikom u glukonolakton (ili u glukonsku kiselinu) i H_2O_2 . Razvijeni H_2O_2 naknadno se određuje elektrokemijski.

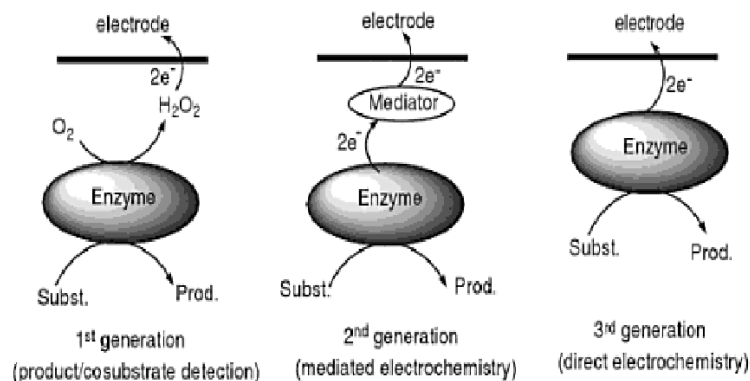


Mnogi drugi enzimi koji su danas komercijalno dostupni služe za razvoj raznih biosenzora. Pored najbolje elektrokemijski ispitanih, mogu se upotrijebiti i drugi principi za konvertiranje signala kao što su akustični efekti, kalorimetrijski i optički.

1.2.1. Generacije biosenzora

Postoje tri generacije biosenzora. Kod prve generacije biosenzora, produkt reakcije difundira do elektrode gdje se oksidira ili reducira. Kod druge generacije biosenzora uključeni su specifični posrednici (medijatori) između osnovnog biološkog dijela i medijatora. Kod treće generacije biosenzora reakcija sama prouzrokuje odziv na elektrodi u što nije uključen niti produkt niti medijator kemijske reakcije. U novije vrijeme postignut je znatan napredak u razvoju treće generacije biosenzora baziran na direktnom prijenosu elektrona između elektrode i biološkog elementa. Istraživanja su posebno fokusirana na voltametriji koja nudi efikasan način direktnog prijenosa elektrona između proteina i elektrode.

Kod specifičnih biosenzora baziranih na upotrebi enzima, tri generacije biosenzora su shematski prikazane na Slici 6.



Slika 6 - Tri generacije enzimskih elektrokemijskih biosenzora

1.2.1.1. Prva generacija biosenzora

Razvoj biosenzora na bazi enzima znatno je uznapredovao u posljednje vrijeme jer se došlo do novih spoznaja u razumijevanju mehanizama vezanih za funkcioniranje aktivnih centara enzima. U početku se enzimska elektrokemija oslanjala na voltametrijsku detekciju proizvoda enzima. U početku se enzimska elektrokemija oslanjala na voltametrijsku detekciju proizvoda odnosno kosupstrata (poput H_2O_2) i to je bila takozvana prva generacija biosenzora, Slika 6. Uobičajeni analit koji je detektiran na ovaj način je vodikov peroksid, uobičajan proizvod reakcije enzima iz grupe oksidaza, pri čemu se kisik reducira. Sam proizvod može biti elektroaktivan, ali ne nužno.

1.2.1.2. Druga generacija biosenzora

Druga generacija biosenzora izbjegava oksidaciju/redukciju produkata ili reaktanata iz sustava zamjenjujući prijenos signala s redoks aktivnim koordinacijskim spojem ili redoks organskom molekulom. U elektrokemiji medijator ima dvojaku ulogu. Prvo, homogeni prijenos elektrona vraća enzim u prethodni aktivni oblik za slijedeći redoks ciklus, a zatim heterogeni prijenos elektrona s radnom elektrodom osigurava struju koja kvantificira enzim-supstrat reakciju. Ovaj pristup danas je osnova rada većine komercijalnih biosenzora, uključujući i biosenzor temeljen na enzimu glukoza oksidaza koji koristi ferocen medijator. Ovoj klasifikaciji pripada i korištenje redoks aktivnih polimera adsorbiranih na površini elektrode. U svim slučajevima nastale struje su generirane na formalnom redoks potencijalu

medijatora, a ne enzima. U idealnom slučaju redoks potencijal medijatora je blizak onom koji pripada aktivnom redoks centru enzima. Cilj je izbjegnuti veliki prenapon koji može dovesti do nespecifičnih redoks reakcija.

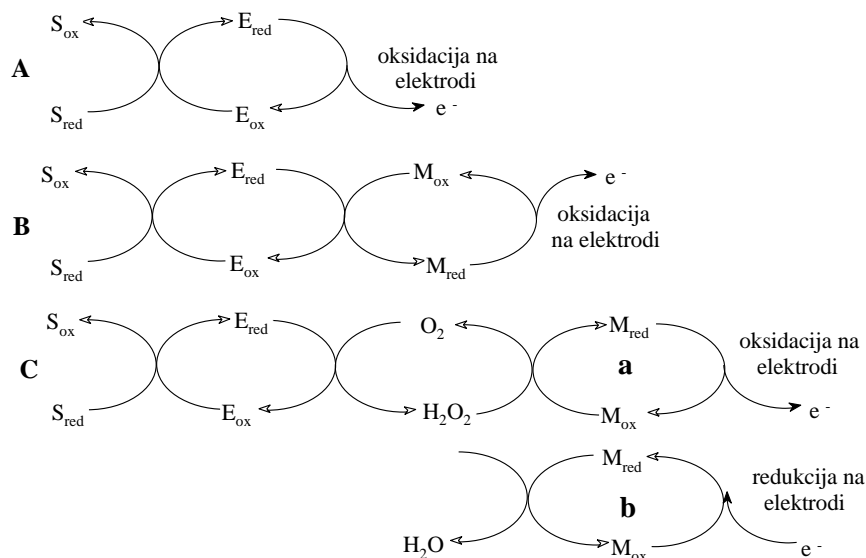
1.2.1.3. Treća generacija biosenzora

Osnova principa treće generacije biosenzora je uklanjanje svih kosupstrata iz sustava kako prirodnih tako i umjetnih s ciljem postizanja direktne razmjene elektrona između enzima i elektrode. Iako ovoj vrsti biosenzora tek predstoji komercijalna primjena, ona nudi značajne prednosti u odnosu na sustave s medijacijom (druga generacija biosenzora). Postoje mnogi zasada neriješeni problemi kod direktne enzimске elektrokemije. Oni uključuju izbjegavanje denaturacije enzima zbog njegove adsorpcije na elektrodnoj površini uz istovremeno osiguranje efikasne elektronske komunikacije između aktivnog centra enzima ili nekog drugog redoks kofaktora unutar enzima i elektrode.

1.2.2. Amperometrijski biosenzori

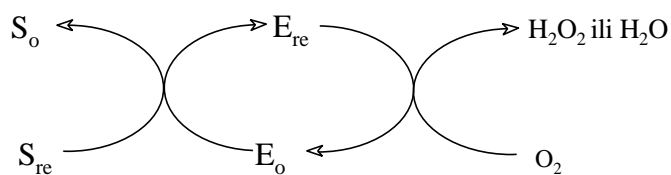
Novija istraživanja, u području elektrokemijskih senzora, temeljena na modificiranim ugljikovim materijalima, dovela su do razvoja biosenzora. Od svih analitičkih elektrokemijskih tehnika, amperometrija je najviše korištena tehnika. Ova tehnika omogućava kronoamperometrijska mjerenja u protočnim sustavima (Protočno injekcijska analiza; PIA) i mjerenja u elektrokemijskoj ćeliji bez protoka (Hidrodinamička amperometrija; HA) [16]. Elektrokemijski biosenzori kombiniraju prednosti elektrokemijskih analitičkih tehnika sa specifičnošću procesa biološkog “prepoznavanja”. Cilj je biološki proizvesti električni signal koji je proporcionalan koncentraciji. U tu svrhu se biospecifični reagens imobilizira na odgovarajuću elektrodu koja transformira proces biološkog prepoznavanja u kvantitativni amperometrijski ili potenciometrijski odziv. Takva kombinacija elektroda-biokomponenta nudi novo snažno analitičko sredstvo. Primjena moderne tehnologije dovela je do proizvodnje lako upotrebljivih, kompaktnih i jeftinih biosenzora [16]. Znanja potrebna za razvoj biosenzora moraju se ujediniti kroz suradnju mnogih područja (multidisciplinarni pristup). Rezultati te suradnje u mnogim slučajevima će napraviti samo male pomake, ali sigurno je to da je to jedini put ka daljnjem razvoju [17].

Razvoj elektrokemijskih biosenzora se odvija u različitim pravcima. Općenito se mogu razlikovati dvije vrste elektrokemijskih biosenzora ovisno o prirodi relacije bioloških procesa - biokatalitički sustav (enzimi, ćelije ili tkiva kao imobilizirane biokomponente) te senzori na bazi afiniteta (antitijela, membranski receptori ili nukleinske kiseline). Biosenzori kao biokatalitički sustavi najčešće se temelje na oksidoreduktazama s obzirom da kataliziraju konverziju intermedijera u produkte. Najčešće upotrebljavani enzimi su oksidaze i dehidrogenaze.



Slika 7 - Mogućnosti uporabe redoks enzimskih reakcija za kemijske biosenzore (oksidacija supstrata) u amperometrijskom određivanju. (S - supstrat, M - medijator, E - enzim; indeks *ox* označava oksidiranu formu, a indeks *red* reduciranu formu). A - sustav direktne elektrokemijske oksidacije reduciranog enzima bez posrednika; B - direktno posredovanje sa M u ulozi elektron akceptora; C - određivanje vodikovog peroksida koji može biti reducirajući (a) i oksidirajući (b) spoj, posredovanjem M.

Sve oksidaze ovise o kofaktoru koji je snažno vezan unutar enzimske strukture. Struktura redoks kofaktora je tipa FAD [18]. Strukture kofaktora za sve enzime još nisu potpuno objašnjene. Ovi enzimi također mogu sadržavati ione metala čija je funkcija još uvijek nejasna (npr. Fe ili Mo). Sve oksidaze troše molekularni kisik kao oksidirajuću molekulu u katalitičkom ciklusu. Ovisno o moći enzima da katalizira prijenos dva ili četiri elektrona molekularnom kisiku, nastaje ili vodikov peroksid ili voda (Slika 8) [19]. Zbog velike oksidacijske moći molekularnog kisika, sve reakcije katalizirane oksidazama smatraju se ireverzibilnima ukoliko se odvijaju uz djelovanje ovog prirodnog elektron akceptora.



Slika 8 - Reakcijske sekvence za oksidacijsku reakciju kataliziranu oksidazom uz potrošnju molekularnog kisika kao elektron-proton akceptora.

Na bazi reakcijske sheme na Slici 7 može se izvršiti klasifikacija u tri grupe za slučaj oksidacije supstrata na površini biosenzora.

1.3. Određivanje peroksida elektrokemijskim biosenzorima

Biosenzor je analitički uređaj koji kombinira biološke elemente/molekule s pretvornicima za mjerenje koncentracije analita. On pretvara biološki signal u električne signale. Biosenzor mora biti selektivan, precizan i neovisan o interferirajućim vrstama. Biosenzori se mogu razvrstati u enzimске i neenzimske biosenzore prema sastavu elementa bio-prepoznavanja [20].

1.3.1. Potenciometrijski H_2O_2 biosenzori

Potenciometrijski biosenzori mjere električni potencijal elektrode pri otvorenom strujnom krugu, što čini razliku u potencijalu između radne i standardne elektrode. Ovi biosenzori temelje se na ionsko-selektivnim elektrodama za otkrivanje ciljanih iona tijekom bioloških reakcija. U potenciometrijskim biosenzorima, enzim je imobiliziran na površini elektrode, a promjena koncentracije kosupstrata predstavlja analitički signal [21].

1.3.2. Amperometrijski H_2O_2 biosenzori

Amperometrijski biosenzori temelje se na generiranju struje pri stalnom potencijalu između dvije elektrode. Poput potenciometrijskih biosenzora, amperometrijski biosenzori također su pokazali analitičke parametre kao što su vrijeme odziva, linearni rasponi, selektivnost i

osjetljivost. Konvencionalni amperometrijski biosenzori temelje se na Clarkovoj kisikovoj elektrodi. Čelija sadrži Pt katodu i Ag/AgCl protu/referentu elektrodu. Redukcija O_2 se odvija na Pt katodi. Struja redukcije kisika na Pt katodi je obrnuto proporcionalna koncentraciji glukoze u uzorku. Kao elektrolit koristi se otopina KCl, a platinska katoda je odvojena od otopine KCl polupropusnom membranom za kisik (azbestni polimerni keramički matrijal). Stupanj elektrokemijske redukcije kisika ovisi o njegovom difuzijskom kapacitetu ka radnoj elektrodi (Pt elektrodi) [22].

1.3.2.1. Prva generacija H_2O_2 biosenzora

Ova generacija biosenzora zasnivala se na određivanju koncentracije kisika na Clarkovoj elektrodi. Amperometrijski senzor za određivanje kisika je prilagođen na način da mu je površina modificirana s enzimskim slojem (koji sadrži GOD). Koncentracija određenog kisika je obrnuta proporcionalna koncentraciji glukoze u uzorku.

1.3.2.2. Druga generacija H_2O_2 biosenzora

Osjetljivi amperometrijski biosenzor na bazi hren preoksidaze (HRP), razvijen je pomoću taloženja nanočestica zlata (AuNP-a) na trodimenzionalnu (3D) poroznu karboniziranu membranu (CESM). Zbog sinergijskih učinaka jedinstvenog poroznog sastava ugljika i dobro raspoređenih AuNPs, enzimom modificirana elektroda pokazala je izvrsno elektrokemijsko redukcijsko ponašanje. HRP-AuNPs-CESM-GC elektroda pokazala je dobru točnost i visoku osjetljivost s linearnim rasponom od $10\text{--}2700\ \mu\text{mol dm}^{-3}\ H_2O_2$ i granicom određivanja (LOD) od $3\ \mu\text{mol dm}^{-3}\ H_2O_2$ [23].

Jednostavan i jeftin H_2O_2 biosenzor razvijen je korištenjem Yucca filamentosa u kombinaciji s O_2 senzorom. Biosenzor je pokazao linearno područje od $85\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ do $3750\ \mu\text{mol dm}^{-3}$, H_2O_2 s granicom određivanja od $15,1\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ i ponovljivošću (1,024%, $n = 10$). Uspješno je primijenjen za određivanje koncentracije H_2O_2 u nekim komercijalnim uzorcima [24].

1.3.2.3. Treća generacija H_2O_2 biosenzora

Biosenzori na bazi elektroda načinjenih od nanomaterijala dalje su klasificirani kao biosenzori na osnovi membrane i elektroda. Biosenzori na osnovi elektrodnog sastava mogu se razvrstati temeljem nanomaterijala koji se koriste u njihovoj sintezi:

- Elektronski reducirani grafenski oksid (ERGO) / GCE jednostavan je neenzimski H_2O_2 senzor. Razvijen je pomoću elektrokemijski reduciranog grafenskog oksida (ERGO) - modificirane GC elektrode. Modificirana GC elektroda karakterizirana je FTIR-om, UV-vidljivim spektrom, skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) i mikroskopom atomske sile (AFM). Ciklička voltametrijska analiza (CV) otkrila je da ERGO / GCE imaju naglašena katalitička svojstva za prijenos naboja za standardne redoks sustave i pokazuju izvrsnu učinkovitost prema elektro redukciji H_2O_2 . Amperometrijsko istraživanje pomoću ERGO / GCE pokazalo je visoku osjetljivost ($0,3 \mu\text{A}/\mu\text{mol dm}^{-3}$) i brži odziv nakon dodavanja H_2O_2 pri primijenjenom potencijalu od $-0,25 \text{ V}$ vs Ag/AgCl. LOD je bio $0,7 \mu\text{mol dm}^{-3}$, a vrijeme postizanja stabilne struje stacionarnog stanja bilo je $<3 \text{ s}$ za linearni raspon koncentracije H_2O_2 ($1\text{-}16 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Osim toga, modificirana GC elektroda ima dugotrajnu stabilnost [25].

- Dijamantna elektroda dopirana borom (BDDE), modificirana s kobaltovim ftalacijanimom (CoPc-BDD) koristi se za osjetljivo određivanje H_2O_2 . Istraženo je elektrokemijsko određivanje vodikovog peroksida kod modificirane elektrode. Ciklička voltametrija otkrila je da CoPc-BDD elektroda ima katalitičku aktivnost za elektrokemijsku oksidaciju H_2O_2 . Koristeći analizu s injektiranjem u protok-protočna injekcijska analiza (FIA-EC), CoPc-BDD elektroda pokazuje slijedeće analitičke parametre: linearno područje: $10 \text{ nmol dm}^{-3}\text{-}10 \mu\text{mol dm}^{-3}$, LOD: 10 nmol dm^{-3} , radni potencijal: $-0,6 \text{ V}$ [26].

- Hb [pluron P123-nanografen trombocit (NGP)] elektroda je amperometrijski H_2O_2 biosenzor, proizveden imobilizacijom Hb na pluronskom P123 nanografenskom trombocitu (NGP). Biosenzor je pokazao linearni odgovor na H_2O_2 u rasponu od $10\text{-}150 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i LOD od $8,24 \mu\text{mol dm}^{-3}$ pri $0,20 \text{ V}$, pH 7,0 i 25°C .

- Hemoglobin (Hb) – kolagen modificirana elektroda s trodimenzionalnom konfiguracijom proizvedena je elektrorotirajućom metodom. Izravni prijenos elektrona imobiliziranog Hb u kolagen bio je uvelike olakšan. Amperometrijski odgovor biosenzora varirao je linearno s koncentracijom H_2O_2 u rasponu od $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ do $30 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, s LOD od $0,37 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ [27].

- DNA / Hb / Au biosenzor H_2O_2 konstruiran je imobilizacijom DNA i Hb na površinu Au elektrode, sloj po sloj. Senzor koji se temelji na reakciji željezovih kationa u prijenosu Hb pokazao je dobar elektrokatalitički odgovor na redukciju H_2O_2 . Ovaj senzor ima izvrstan elektrokemijski odgovor za niske koncentracije H_2O_2 s visokom osjetljivošću, selektivnošću te kratkim vremenom odziva. U idealnim uvjetima (potencijal 0,75 i pH 5,0), linearnost za određivanje H_2O_2 bila je 10-120 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ s LOD od 0,4 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ [28].

- Grafen s nanočesticama platine (GPtNPs) jednostavna je i vrlo osjetljiva platforma, razvijena za sintezu razgranatih Pt nanostruktura na grafenu. Ovakav grafen korišten je za povećanje performansi platinastih nanostruktura (PtN) u elektrokemijskim senzorima / biosenzorima. Modulirana elektroda PtNs (GPtNs), podržana na grafenu, učinkovito oksidira H_2O_2 pri nižem potencijalu u neutralnom fosfatnom puferu bez upotrebe enzima ili redoks posrednika. GPtNs elektroda pokazala je visoku osjetljivost 811,26 $\mu\text{A/mol dm}^{-3}$ i linearni raspon, 0-0,32 mmol dm^{-3} , s vrlo niskim LOD (1 nmol dm^{-3}) za H_2O_2 na potencijalu 0,45 V i pH 7,0. Senzor je pokazao dugotrajnu stabilnost i reproducibilnost [29].

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Priprava elektrodnog materijala

Tijekom mjerenja korištena je nemodificirana elektroda od ugljikove paste (nCPE) i modificirana elektroda s 5% MnO_2 (mCPE). Za pripravu elektrodnog materijala za nCPE korišteno je 1 g grafita i 400 μL parafinskog ulja, dok je za pripravu mCPE korišteno 0,95 g grafita i 0,05 g MnO_2 uz dodatak 400 μL parafinskog ulja. Smjesa prahova je prethodno homogenizirana i u nju se dodavalo parafinsko ulje do zadovoljavajuće konzistencije. Pasta je homogenizirana u tarioniku. Ovako pripremljenu pastu smo prenijeli u odgovarajuće tijelo od injekcije

Površina elektrode iznosila je $0,2 \text{ cm}^2$, a prije svakog mjerenja nanovo se skidao površinski sloj radi reproducibilnosti.

2.2. Priprava otopina

Za pripravu otopina koje su bile potrebne za eksperiment korištene su sljedeće kemikalije:

Tablica 1 - Kemikalije korištene za pripravu eksperimentalnih otopina

kemikalija	molekulska formula	dobavljač
natrijev hidrogenfosfat	Na_2HPO_4	p.a. "Kemika", Zagreb
kalijev nitrat	KNO_3	p.a. "Kemika", Zagreb
natrijev acetat	CH_3COONa	p.a. "Kemika", Zagreb
amonijev klorid	NH_4Cl	p.a. "Kemika", Zagreb
boraks	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$	p.a. "Kemika", Zagreb
amonijak	NH_3	p.a. "Kemika", Zagreb
fosforna kiselina	H_3PO_4	p.a. "Kemika", Zagreb
octena kiselina	CH_3COOH	p.a. "Kemika", Zagreb
vodikov peroksid	H_2O_2	p.a. "Kemika", Zagreb

2.2.1. Priprava otopine vodikovog peroksida različitih koncentracija

Otopina vodikovog peroksida, koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pripravljena je otapanjem 0,373 g tj. 335 μL vodikovog peroksida (H_2O_2), u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni

volumen od 30 cm³. Za pripravu 0,01 moldm⁻³ uzeto je 3 cm³ prethodno napravljene (0,1 moldm⁻³) otopine vodikovog peroksida te razrijeđeno na volumen od 30 cm³, a zatim je 3 cm³ te otopine iskorišteno za pripravu 0,001 mol dm⁻³.

Ovako priređene otopine korištene su u elektrokemijskim mjerenjima i to na način da se od svake dodavao određeni volumen u ćeliju s 100 cm³ osnovnog elektrolita, za postizanje konačne koncentracije (Tablica 2).

Tablica 2 –Koncentracije vodikovog peroksida koje su korištene pri mjerenju

$c(\text{H}_2\text{O}_2)$ – korištena za pripravu / moldm ⁻³	$V(\text{H}_2\text{O}_2)_{30\%}$	$c(\text{H}_2\text{O}_2)$ – dodavana u ćeliju / moldm ⁻³
0,001	50 µL	5×10^{-7}
0,01	50 µL	5×10^{-6}
0,1	50 µL	5×10^{-5}
0,1	500 µL	5×10^{-4}
0,1	5000 µL	5×10^{-3}

Prilikom svakog novog mjerenja pripremljena je uvijek nova otopina H₂O₂.

2.2.2. Priprava otopine kalijevog nitrata - KNO₃

101,075 g kalijevog nitrata otopljeno je u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni volumen od 2 dm³. Koncentracija ove otopine je bila 0,5 moldm⁻³. Iz ove otopine pripravljena je 0,1 moldm⁻³ otopina kalijevog nitrata, korištenjem 18 cm³ otopine KNO₃ koncentracije 0,5 moldm⁻³ koja je razrijeđena do konačnog volumena od 90 cm³.

2.2.3. Priprava otopine natrijevog acetata - CH_3COONa

Otopina natrijevog acetata pripravljena je otapanjem 2,05 g CH_3COONa u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni volumen od $0,25 \text{ dm}^3$. Koncentracija ove otopine je $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ $\{c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}\}$.

2.2.4. Priprava otopine acetatnog pufera; pH 4

Dodavanjem koncentrirane otopine CH_3COOH u otopinu CH_3COONa ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) prilagođava se pH do željene vrijednosti ($\text{pH} = 4$). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

2.2.5. Priprava otopine natrijevog hidrogenfosfata - Na_2HPO_4

3,548 g natrijevog hidrogenfosfata otopljeno je u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni volume od $0,25 \text{ dm}^3$. Koncentracija ove otopine bila je $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ $\{c(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}\}$.

2.2.6. Priprava otopine fosfatnog pufera; pH 7

Dodavanjem koncentrirane otopine H_3PO_4 u otopinu Na_2HPO_4 ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) prilagođava se pH do željene vrijednosti ($\text{pH} = 7$). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

2.2.7. Priprava otopine amonijevog klorida - NH_4Cl

Otopina amonijevog klorida pripravljena je otapanje 1,56 g NH_4Cl u deioniziranoj vodi razrjeđenjem na konačni volumen od $0,25 \text{ dm}^3$. Koncentracija ove otopine bila je $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ $\{c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}\}$.

2.2.8. Priprava otopine amonijačnog pufera; pH 9

Dodavanjem koncentrirane otopine NH_3 u otopinu NH_4Cl ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) prilagođava se pH do željene vrijednosti ($\text{pH} = 9$). Ovo dodavanje se vrši uz stalno praćenje pH vrijednosti pH-metrom.

2.2.9. Priprava otopine boratnog pufera; pH 9

Boratni pufer je pripravljen otapanjem 9,5 g boraksa ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$) u $0,25 \text{ dm}^3$ deionizirane vode. Pripravljeni pufer je bio koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ s pH 9.

2.2.10. Priprava elektrolitne otopine

Elektrolitna otopina se sastojala od 90 cm^3 $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ KNO_3 i 10 cm^3 odgovarajućeg pufera.

2.3. Aparatura

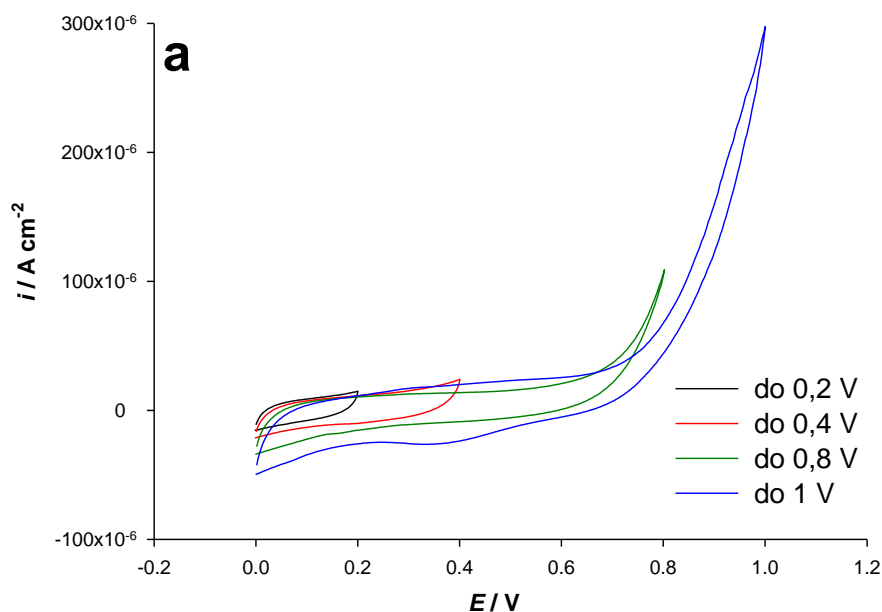
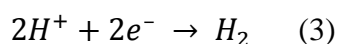
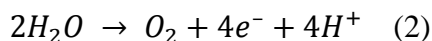
Korištena je elektrokemijska ćelija sa Ag/AgCl kao referentnom, platinskom pločicom kao protuelektrodom te elektrode građene od ugljikove paste kao radne elektrode.

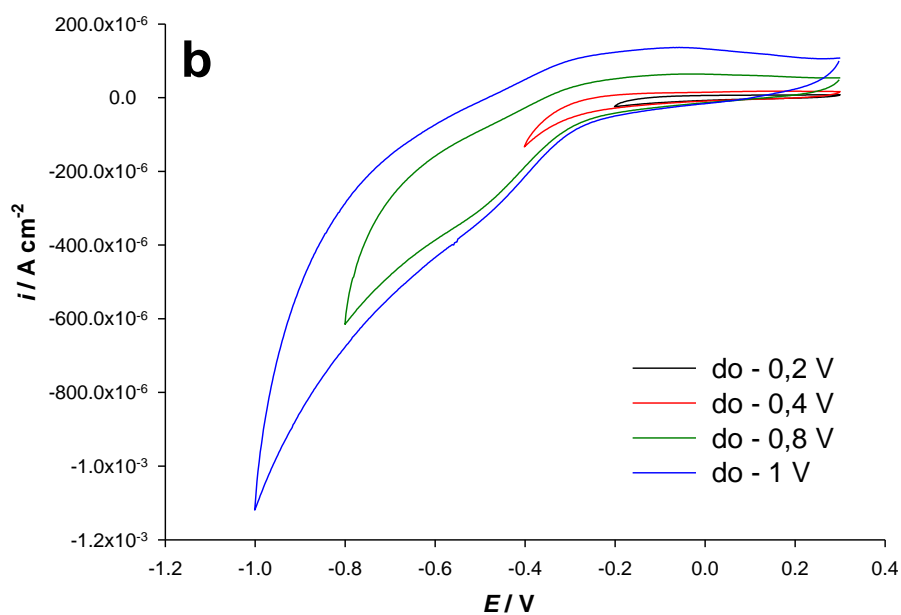
Sva elektrokemijska mjerenja su izvršena s potencijostatom (Autolab PGSTAT 302N) spojenim na osobno računalo (PC), a kojim se upravlja pomoću GPES 4.9 Softwarea (Eco Chemie).

3. REZULTATI I RASPRAVA

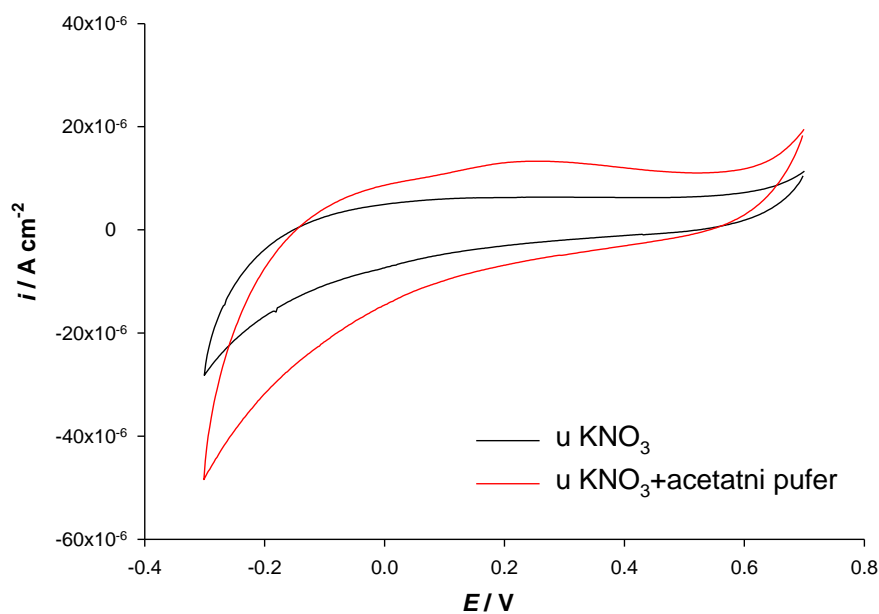
3.1. Elektrokemijsko ponašanje nCPE

Sva mjerenja su rađena na sobnoj temperaturi. Prva ispitivanja bila su usmjerena na određivanje radnog područja nemodificirane elektrode od ugljikove paste (nCPE). U tu svrhu snimani su ciklički voltamogrami (CV) od potencijala otvorenog strujnog kruga (OCP) ka katodnim i anodnim potencijalima. Snimljeni CV su prikazani na Slici 9. Vidljivo je da pri potencijalima većim od +0,8 V dolazi do anodnog izlučivanja kisika (reakcija 2), odnosno pri katodnim potencijalima od –0,4 V do katodnog izlučivanja vodika (reakcija 3). U skladu s dobivenim rezultatima za radno područje elektroda temeljenih na ugljikovoj pasti odabrano je područje od –0,3 do +0,7 V.



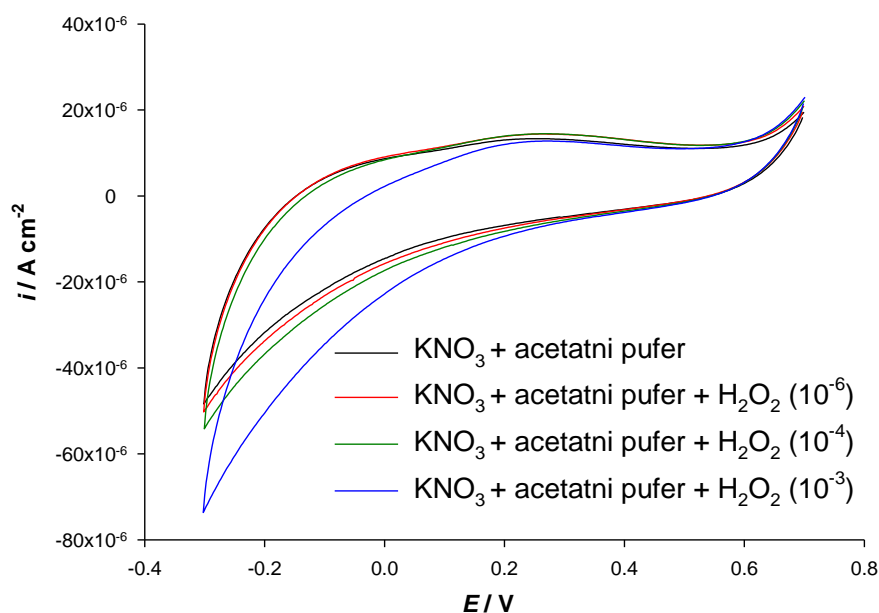


Slika 9 – Utjecaj anodne (a) i katodne (b) granice na CV nCPE u $0,1\ mol\ dm^{-3}\ KNO_3$.



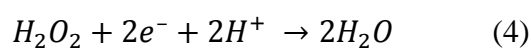
Slika 10 – Utjecaj acetatnog pufera (pH 4) na CV nCPE.

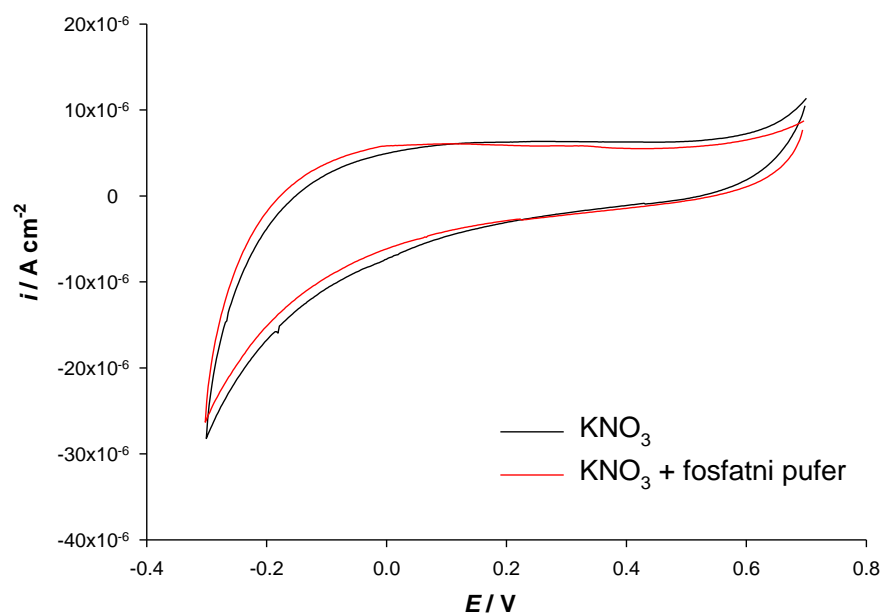
Na Slici 10 prikazan je CV nCPE u odabranom području potencijala u prisutnosti acetatnog pufera. Iz CV je vidljivo povećanje osnovne struje u odnosu na CV koji je snimljen u KNO_3 što odgovara promjeni ionske jakosti. Nadalje, izraženija je reakcija katodnog izlučivanja vodika što je u skladu s pH vrijednošću otopine.



Slika 11 – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida (mol dm^{-3}) na CV nCPE pri pH 4.

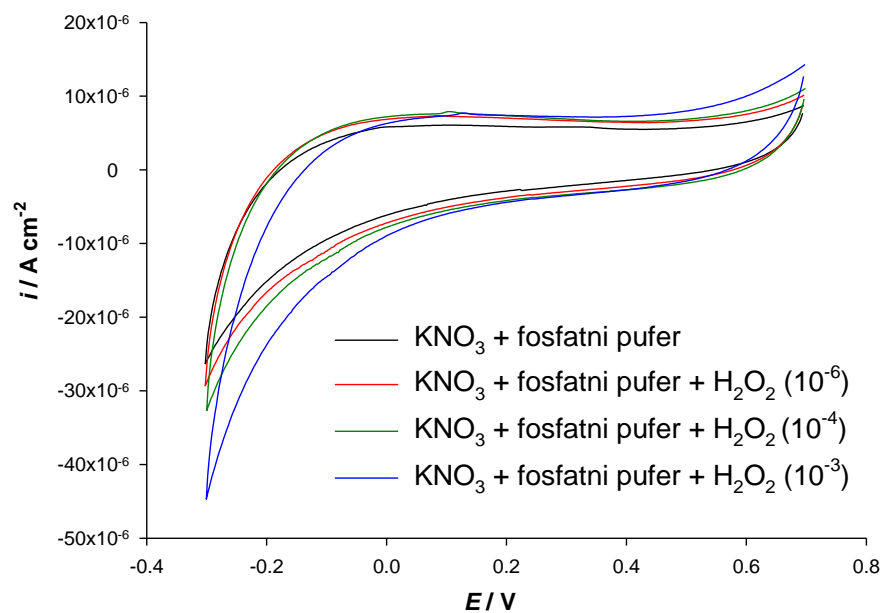
Moguća katalitička svojstva nCPE naspram elektrokemijske oksidacije ili redukcije vodikovog peroksida u kiselom mediju, u datom području potencijala, ispitivana su snimanjem CV u prisutnosti različitih koncentracija peroksida. Snimljeni CV prikazani su na Slici 11. Iz CV vidljive su nešto izraženije katodne struje pri koncentraciji peroksida $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, vjerojatno kao posljedica katodne redukcije peroksida. Prema tome značajnije promjene CV s dodatkom vodikovog peroksida nisu uočene.





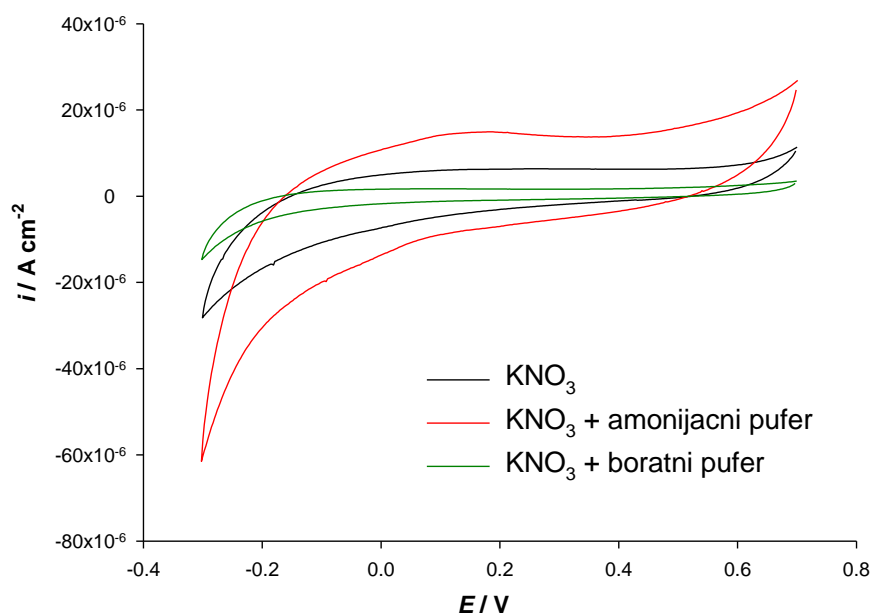
Slika 12 – Utjecaj fosfatnog pufera (pH 7) na CV nCPE.

Na Slici 13 prikazan je CV nCPE u odabranom području potencijala u prisutnosti fosfatnog pufera. Iz CV nisu vidljive značajnije promjene s dodatkom fosfatnog pufera.



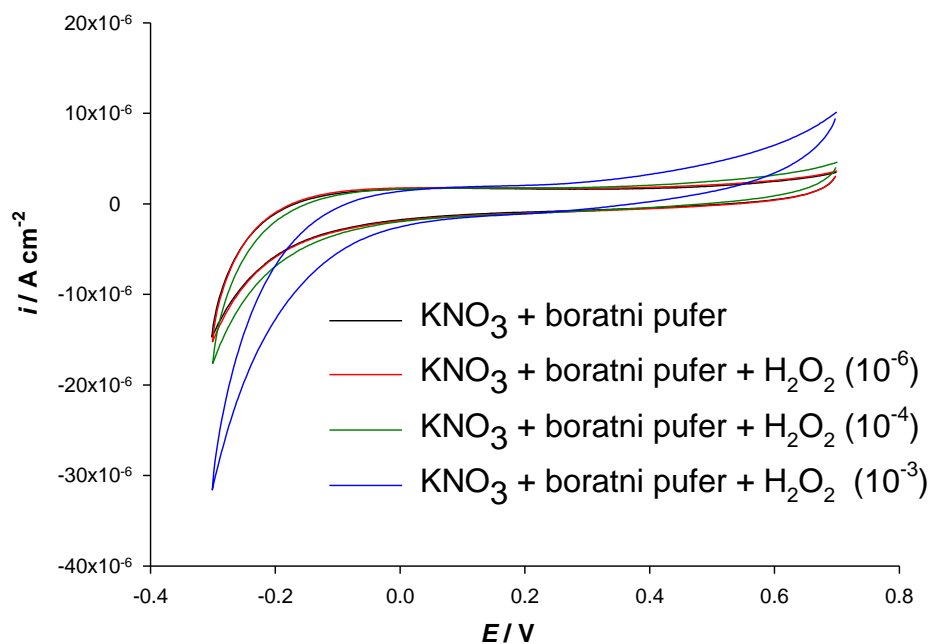
Slika 13 – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida (mol dm^{-3}) na CV nCPE pri pH 7.

Moguća katalitička svojstva nCPE naspram elektrokemijske oksidacije ili redukcije vodikovog peroksida u neutralnom mediju, u datom području potencijala, ispitivana su snimanjem CV u prisutnosti različitih koncentracija peroksida. Snimljeni CV prikazani su na Slici 13. Iz CV vidljive su nešto izraženije katodne struje pri koncentraciji peroksida 10^{-3} mol dm^{-3} , vjerojatno kao posljedica katodne redukcije peroksida. U odnosu na CV pri istim koncentracijama vodikovog peroksida pri pH 4, katodne struje nešto su manje, što je i u skladu s reakcijom 4. Prema tome značajnije promjene CV s dodatkom vodikovog peroksida nisu uočene.



Slika 14 – Utjecaj boratnog (pH 9) i amonijačnog (pH 9) pufera na CV nCPE.

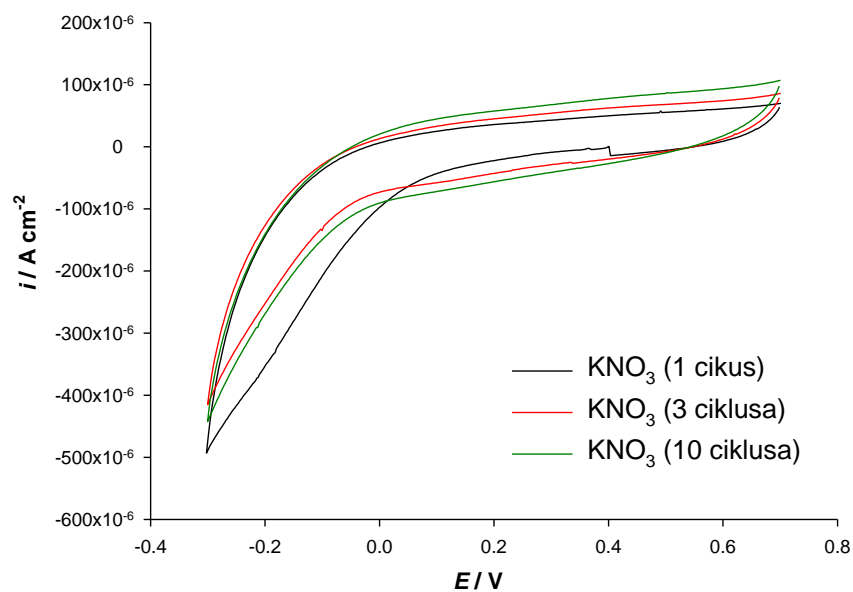
Utjecaj vrste pufera pri pH 9 na CV snimljene na nCPE prikazani su na Slici 14. Iz CV vidljive su znatno veće osnovne struje u slučaju kada je kao pufer korištena amonijačna otopina. U skladu s dobivenim rezultatima zbog manjih osnovnih struja mjerenja pri pH 9 rađena su s boratnim puferom.



Slika 15 – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida (mol dm^{-3}) na CV nCPE pri pH 9.

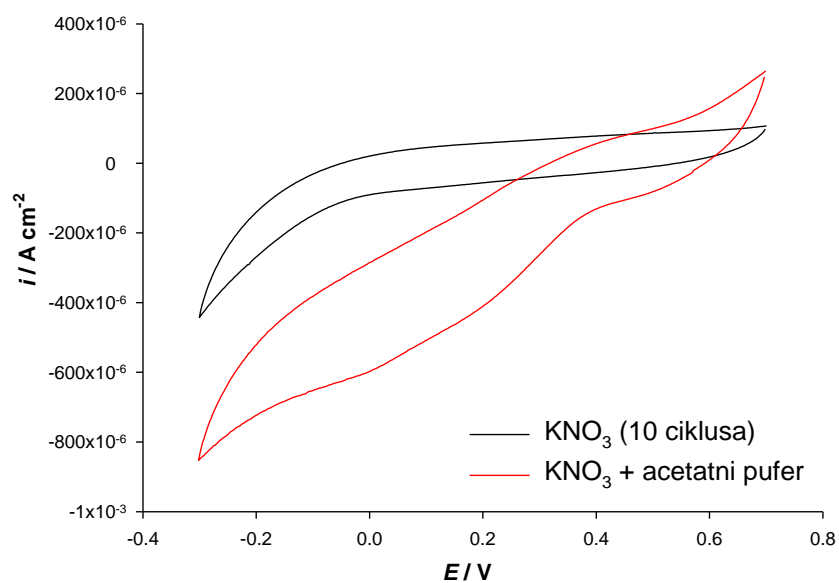
Moguća katalitička svojstva nCPE naspram elektrokemijske oksidacije ili redukcije vodikovog peroksida u lužnatom mediju, u datom području potencijala, ispitivana su snimanjem CV u prisutnosti različitih koncentracija peroksida. Snimljeni CV prikazani su na Slici 15. Iz CV vidljive su nešto izraženije katodne struje pri koncentraciji peroksida $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, vjerojatno kao posljedica katodne redukcije peroksida. U odnosu na CV pri istim koncentracijama vodikovog peroksida pri pH 4 i pH 7, katodne struje još su nešto manje, što je i u skladu s reakcijom 4. Prema tome značajnije promjene CV s dodatkom vodikovog peroksida nisu uočene.

3.2. Elektrokemijsko ponašanje mCPE



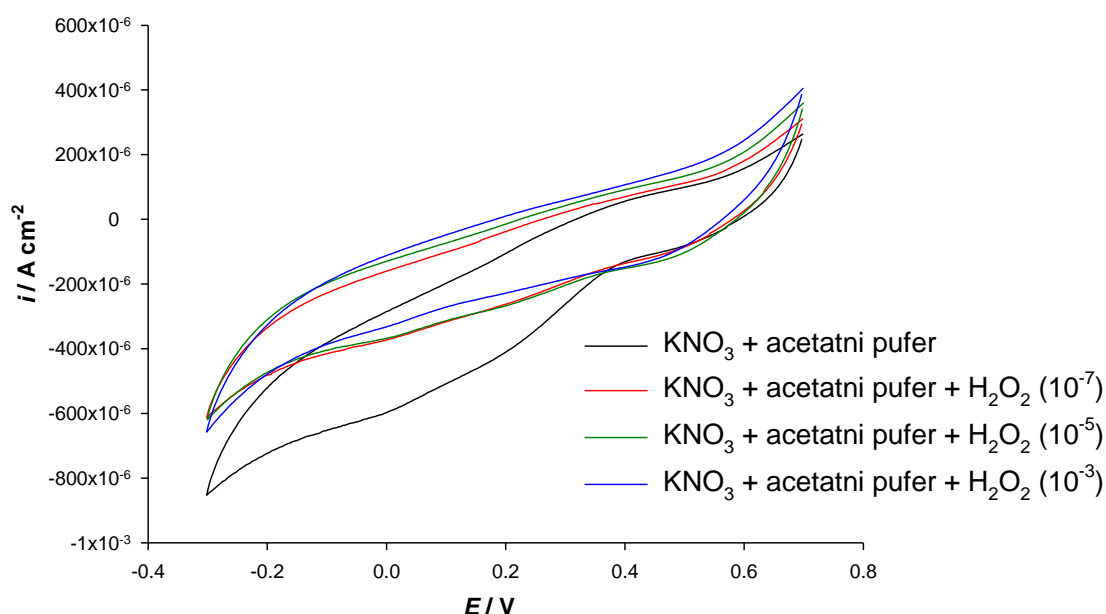
Slika 16 – Utjecaj broja ciklusa na CV za elektrodu modificiranu s 5% MnO_2 (mCPE) u $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KNO}_3$.

Radi uvida u moguće elektrokemijske reakcije MnO_2 , snimljeni su CV elektrode modificirane s 5% MnO_2 s različitim brojem ciklusa. Na Slici 16 nije vidljiv utjecaj broja ciklusa na CV mCPE.



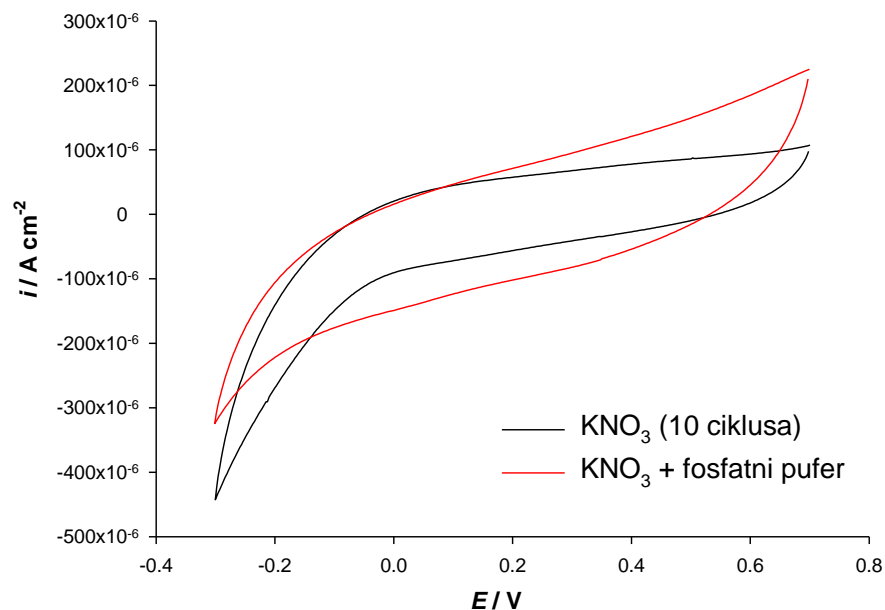
Slika 17 – Utjecaj acetatnog pufera (pH 4) na CV mCPE.

Na Slici 17 prikazan je CV mCPE u odabranom području potencijala u prisutnosti acetatnog pufera. Iz CV je vidljivo povećanje osnovne struje u odnosu na CV snimljen u KNO_3 , zajedno s izraženijom reakcijom katodnog izlučivanja vodika što je u skladu s pH vrijednošću otopine i možebitnog elektrokatalitičkog djelovanja MnO_2 na reakciju 3.



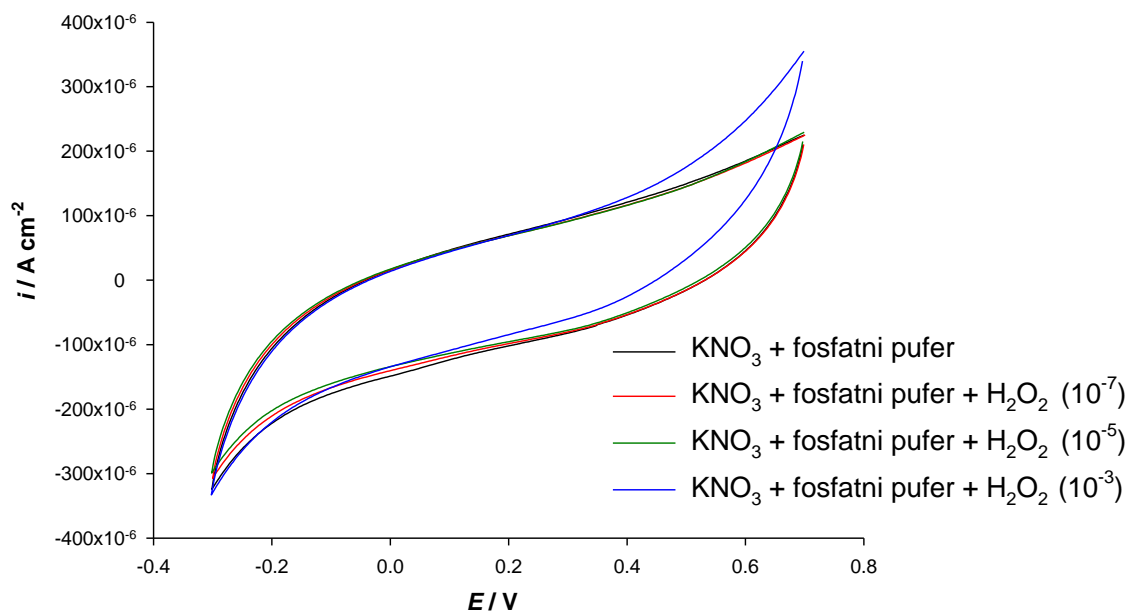
Slika 18 – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida (mol dm^{-3}) na CV mCPE pri pH 4.

Moguća katalitička svojstva mCPE naspram elektrokemijske oksidacije ili redukcije vodikovog peroksida u kiselom mediju, u datom području potencijala, ispitivana su snimanjem CV u prisutnosti različitih koncentracija peroksida. Snimljeni CV prikazani su na Slici 18. Iz CV vidljive su nešto manje katodne struje pri dodatku peroksida, vjerojatno kao posljedica slabije katodne redukcije vodika na površini modificirane elektrode zbog prisutnosti vodikovog peroksida i uloge vodikovih kationa kod njegove redukcije. Prema tome značajnije promjene CV s dodatkom vodikovog peroksida nisu uočene.



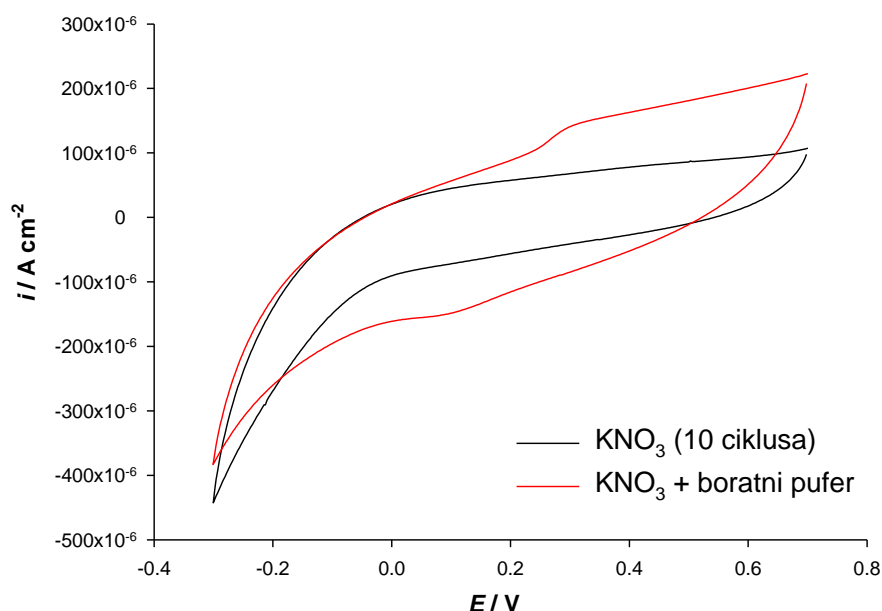
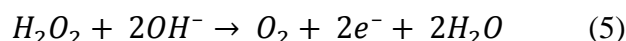
Slika 19 – Utjecaj fosfatnog pufera (pH 7) na CV mCPE.

Na Slici 20 prikazan je CV mCPE u odabranom području potencijala u prisutnosti fosfatnog pufera. Iz CV nisu vidljive značajnije promjene s dodatkom fosfatnog pufera, osim nešto većih osnovnih struja u anodnom području potencijala.



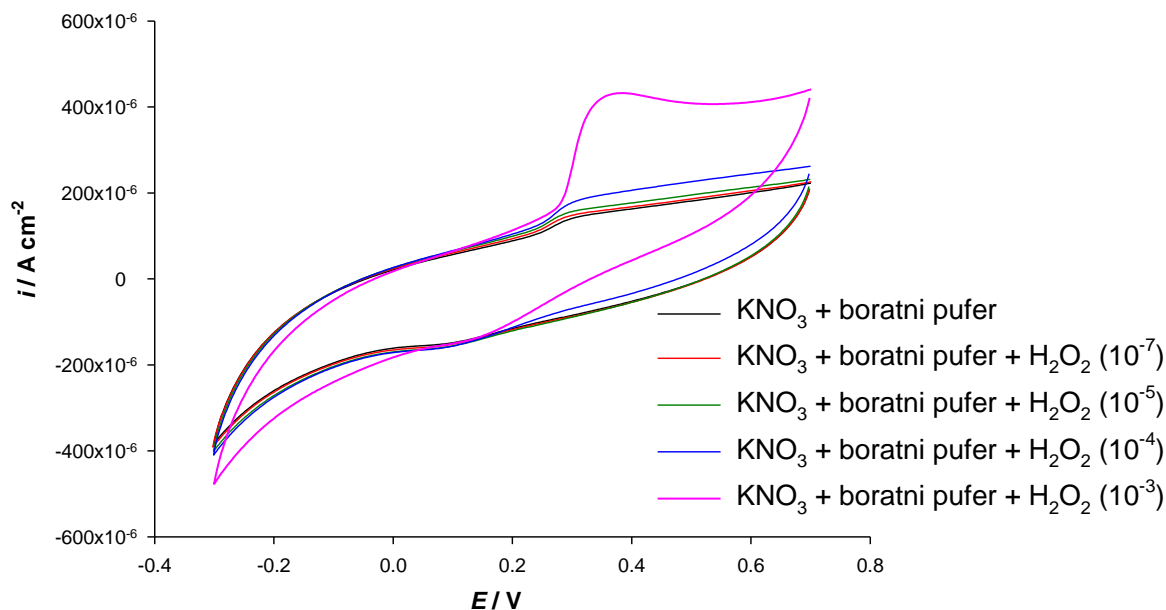
Slika 20 – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida (mol dm^{-3}) na CV mCPE pri pH 7.

Moguća katalitička svojstva mCPE naspram elektrokemijske oksidacije ili redukcije vodikovog peroksida u neutralnom mediju, u datom području potencijala, ispitivana su snimanjem CV u prisutnosti različitih koncentracija peroksida. Snimljeni CV prikazani su na Slici 20. Iz CV vidljiva je nešto izraženija anodna struja pri koncentraciji peroksida 10^{-3} moldm $^{-3}$, vjerojatno kao posljedica anodne oksidacije peroksida. U odnosu na CV pri istim koncentracijama vodikovog peroksida pri pH 4, katodne struje nešto su manje, što je i u skladu s reakcijom 5.



Slika 21 - Utjecaj boratnog pufera (pH 9) na CV mCPE.

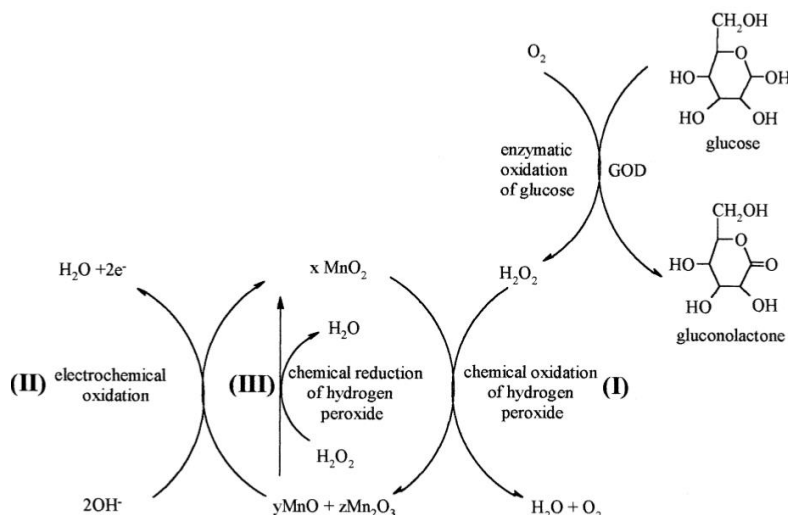
Na Slici 21 prikazan je CV mCPE u odabranom području potencijala u prisutnosti boratnog pufera. Iz CV nisu vidljive značajnije promjene s dodatkom boratnog pufera, osim nešto većih osnovnih struja u mjernom području potencijala.



Slika 22 – Utjecaj dodatka vodikovog peroksida (mol dm^{-3}) na CV mCPE pri pH 9.

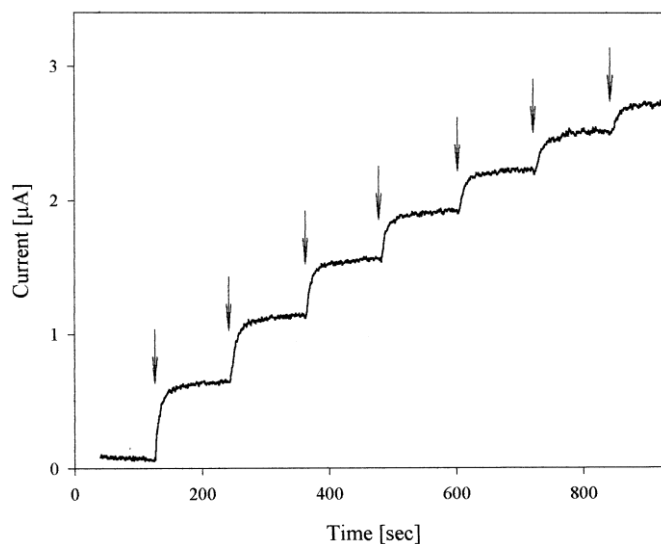
Utjecaj dodatka vodikovog peroksida na CV pri pH 9 za elektrodu mCPE je prikazan na Slici 22. Vidljivo je da do koncentracija peroksida $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ova elektroda ne pokazuje elektrokatalitička svojstva. Za koncentracije veće od $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ dolazi do pojave ireverzibilne oksidacije peroksida. Pojava ovog pika na +0,4 V je u skladu s jednačbom 5 u lužnatom mediju. Iz CV nije vidljiv katodni pik.

U skladu s uočenim rezultatima, može se zaključiti da je moguće ovako modificiranu elektrodu koristiti kao pretvornik za neke enzimske reakcije u kojima sudjeluje vodikov peroksid, bilo kao reaktant ili produkt te reakcije. Kao jedan od primjera korištenja MnO_2 kao pretvornika u takvim reakcijama može se navesti razvoj biosenzora za određivanje glukoze u krvi [30].



Slika 23 – Reakcijski mehanizam glukoze na elektrodi modificiranoj s MnO_2/GOD bazirane na heterogenom ugljičnom materijalu.

U navedenom istraživanju optimalni maseni udio modifikatora je bio između 3,8 i 5 %. Autori su uporabili tehniku printanja senzora uporabom modificirane ugljikove paste na keramičku podlogu. Na navedeni sloj modificirane ugljikove paste je izliven enzim glukoza oksidaza (GOD) prethodno otopljen u polimeru Nafion[®]. Ovako pripravljen biosenzor je bio korišten za određivanje glukoze u hidrodinamičkim uvjetima pri konstantnom potencijalu od 0,48 V prema Ag/AgCl elektrodi.



Slika 24 – Hidrodinamički amperogram glukoze na elektrodi modificiranoj s MnO_2/GOD pri: radnom potencijalu od 0,48 V prema Ag/AgCl u fosfatnom puferu pH 7.4 ($0,1 \text{ mol dm}^{-3}$); strijelice predstavljaju dodatak $250 \mu\text{g cm}^{-3}$ glukoze [30].

4. ZAKLJUČAK

1. Nikakve značajnije elektrokemijske promjene se nisu uočile za nemodificiranu elektrodu pri različitim pH vrijednostima dodatkom vodikovog peroksida.
2. Modificirana elektroda (s 5% MnO_2) je pokazala oksidacijski pik pri pH 9 u boratnom puferu kod dodane koncentracije vodikovog peroksida od $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.
3. Ova pojava je vezana za oksidaciju $\text{Mn}_2\text{O}_3/\text{MnO}$ u MnO_2 , koji je prethodno kemijski reduciran u reakciji s dodanim vodikovim peroksidom.
4. Ova reakcija je potvrda ovog tipa modifikacije kao druge generacije biosenzora za određivanje bioloških vrsta koje kao produkt imaju vodikov peroksid.

5. LITERATURA

- [1] A. Vogel, *Textbook of quantitative chemical analysis*, Longma Scientific and Technical, **1989**
- [2] W. H. McCurdy Jr., H. F. Bell, Titrimetric determination of hydrogen peroxide in alkaline solution, *Talanta* **1994**, *13*, 925
- [3] H. Elias, S. Vayssié in *Peroxide Chemistry, Vol.5* (Eds.: A. Waldemar), Wiley-VCH, **2005**, pp. 128-138
- [4] M. Lopez-Lazaro in *Encyclopedia of Cancer* (Eds.: M.Schwab), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, **2007**, pp. 145-316
- [5] W. Conner, Hydrogen peroxide safety issues, *Office of Scientific and Technical Information*, U.S. Department of Energy, **1993**
- [6] C.C. Winterbourn, *Methods in Enzymology, Vol. 528*, Elsevier, **2013**, pp. 3-25
- [7] H. Choi, J. Cuenca, A novel concentration detection method of hydrogen peroxide using microwave cavity perturbation technique, *2014 44th European Microwave Conference*, IEEE, **2014**
- [8] L. Hu, S. Han, *Electrochemistry Communication*, **2011**, *13*, 1536.
- [9] L. Guadagnini, D. Tonelli, M. Giorgetti, Improved performances of electrodes based on Cu₂-loaded copper hexacyanoferrate for hydrogen peroxide detection, *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 5036
- [10] L. Giannoudi, E. V. Piletska, S. A. Piletsky, *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices*, Landes Bioscience, **2006**, pp. 175-191
- [11] C. S. Pundir, R. Deswal, V. Narwal, Quantitative analysis of hydrogen peroxide with special emphasis on biosensors, *Bioproc. Biosyst. Eng* **2017**, *41*, 313
- [12] IUPAC, **1992**, *64*, p. 148
- [13] D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification, *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 121

- [14] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, C. Adley, An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors, *Biotechnol. Adv.* **2010**, 28, 232
- [15] L. Xuemei, J. G. Kieran, D. Rayan, D. N. Dowling, Whole-Cell Fluorescent Biosensors for Bioavailability and Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls, *Sensors* **2010**, 10, 232
- [16] K. Schachl, *Development of Electrochemical Sensors based on Carbon Electrodes Modified with Manganese Dioxide*, Inaugural Dissertation, Karl-Franzens University, Graz, Austria, **1998**.
- [17] R. Schmidt, F. Scheler, *Biosensors, Fundamentals, Technologies and Applications*, Vol. 17, VCH Publishing, **1992**.
- [18] P. N. Bartlett, P. Tebbutt, R. P. Whitaker, Kinetic aspects of the use of modified electrodes and mediators in bioelectrochemistry, *Prog. React. Kinet.* **1991**, 16, 55
- [19] L. Gorton, Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells, *Electroanal.* **1995**, 7, 23
- [20] C. Gondran in *Chemical Sensors and Biosensors*, Vol. 13 (Eds.: René Lalauze), ISTE Ltd, **2013**, pp. 313- 333
- [21] S. Yunus, A. M. Jonas, B. Lakard in *Encyclopedia of Biophysics* (Eds.: G. C. K. Roberts), European Biophysical Societies' Association (EBSA), **2013**, pp. 51-73.
- [22] J. Punter Villagrasa, J. Colomer-Farrarons, *State of Art in Biosensors*, Vol. 10, **2013**.
- [23] D. Zhang, H. Zhao, Z. Fan, A highly sensitive and selective hydrogen peroxide biosensor based on gold nanoparticles and three-dimensional porous carbonized chicken eggshell membrane, *Plos One* **2015**, 10, 6.
- [24] H. Yue, J. He, D. Xiao, Biosensor for determination of hydrogen peroxide based on *Yucca filamentosa* membrane, *Anal. Methods-UK* **2013**, 5, 5437.
- [25] S. Mutyala, J. Mathiyarasu, *Materials Science and Engineering: C*, **2016**, 69,398.
- [26] T. Kondo, A. Tamura, A. Fujishima, T. Kawai, High Sensitivity Electrochemical Detection of Hydrogen Peroxide at a Cobalt Phthalocyanine-Modified Boron-Doped Diamond Electrode, *ECS Transactions* **2008**, 16, 465
- [27] F. Guo, X. Xu, Z. Sun, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2011**, pp. 140-145

- [28] A. Kafi, F. Yin, H.-K. Shin, Y.-S. Kwon, *Thin Solid Films*, Vol. 499, Elsevier, **2006**, 86.
- [29] T. K. Behera, S. C. Sahu, B. Satpati, Branched Platinum Nanostructures on Reduced Graphene: An excellent Transducer for Nonenzymatic Sensing of Hydrogen Peroxide and Biosensing of Xanthine, *Electrochim. Acta* **2016**, 206, 238
- [30] E. Turkušić, K. Kalcher, K. Schachl, A. Komersova, M. Bartos, H. Moderegger, I. Svancara, K. Vytras, Amperometric determination of glucose with an MnO₂ and glucose oxidase bulk-modified screen-printed carbon ink biosensor, *Anal. Let.*, 34, **2001**, 15, 2633-2647.